

真骨魚類の軟骨におけるカルシトニンmRNAの発現

金沢大学大学院自然科学研究科生命・地球学専攻 小林 大樹

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測研究応用センター, 臨海実験施設

Daiki Kobayashi: Expression of *calcitonin* mRNA in the cartilage of teleosts

カルシトニンは32個のアミノ酸よりなるペプチドホルモンで、血中カルシウム濃度を低下させる。このホルモンは、哺乳類では甲状腺のC細胞より、それ以外の脊椎動物では鰓後腺と呼ばれる内分泌器官において産生される。血中カルシウム濃度を低下させる機構は以下の機序によると考えられている。すなわち、まず、カルシトニンは前破骨細胞に働いて破骨細胞への分化を阻止する結果、破骨細胞の急速な数の減少を起こす。また、骨表面に存在し、プロトンを分泌して骨組織を融解させている破骨細胞に働き、細胞骨格を切断させる結果、著しい形態変化を引き起こし、破骨細胞を骨表面から離脱させる。これらの結果として骨から血中へのカルシウムの溶出が抑制され、血中カルシウム濃度の低下がもたらされる。

これまで鰓後腺やC細胞以外の組織においてもカルシトニンは局所的に産生されており、例えば脳、消化管、肺等にカルシトニン免疫陽性細胞が検出されている。さらに、最近、キンギョにおいては、頭蓋軟骨にもカルシトニン免疫陽性反応を示す細胞が見い出された。一方、ヒトの骨芽細胞においてカルシトニンが発現し、骨芽細胞自体の増殖や分化に関係していることが報告されている。この結果は、血液中のカルシウム濃度を調節するというカルシトニンの全身的な作用とは別に、局所的に産生されたカルシトニンが周囲の細胞の機能や分化に重大な影響を与えていることを強く示唆している。特に、骨は全身的に働くカルシトニンの標的器官の1つなので、その骨自身がカルシトニンを産生することはこのホルモンの作用を考える上で興味深い。したがって、軟骨組織においても、カルシトニンが周囲の細胞にパラクライン的に働いて何らかの影響を与える可能性がある。そこで本研究では、真骨魚の軟骨が実際にカルシトニンを産生しているか否かを生化学的方法及び分子生物学的手法を用いて調べた。

本研究では、軟骨に存在するカルシトニン様物質の生化学的性質を調べるため、まずイwana未成熟個体（体長約15cm）の頭蓋軟骨を直接可溶化してウェスタンブロットを行った。続いて、逆相の高速液体クロマトグラフィー(Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography: RP-HPLC)を用いて軟骨からカルシトニン様物質を分取し、その後ウェスタンブロットを行い、陽性物質の溶出位置を合成サケ・カルシトニンのそれと比較した。

次に、頭蓋骨のどの細胞でカルシトニンが産生されているかを調べるため、サケ・カルシトニンをコードする塩基配列をプローブに用いて*in situ* hybridization法により調べた。なおプローブは、サケ・カルシトニンcDNAのN末端から3'非翻訳領域を含む784bpに相当する部分をPCRで増幅し、それをTベクターに組み込み、Dig-RNA Labeling Kit（日本ロッシュ社）を用いてジゴキシンゲン標識のRNAプローブを作成した。材料には体長約5cmの放流直前のシロザケ稚魚を用いた。頭部のみを4% paraformaldehyde (PFA)で固定し、パラフィンに包埋し、4mmの厚さの組織切片とした。またプローブの有効性を確かめるために、その稚魚の鰓後腺も同様に処理して組織切片とした。

さらに軟骨組織からtotal RNAをキット（ニッポンジーン）により抽出し、RT-PCR（宝酒造）により、実際にカルシトニンをコードする塩基配列が増幅されるか否かを調べた。この時、N末端（5'-CCTTGGA(C/T)AG(A/C)CCCA(G/T)(A/G)TC(C/T)AA(A/G)CG-3'）及びC末端（5'-GT

TGCTCTCAGGCAGGCTGCGTTTCTTGCC-3') プライマーを合成し、カルシトニンcDNA断片を増幅した。反応条件は95°C-1min/35サイクル; 95°C-45sec、55°C-30sec、72°C-1min/35サイクル; 72°C-10min/1サイクルに設定した。Taq DNA polymeraseはGene Taq (ニッポンジーン) を用いた。PCR後、3% NuSieve GTG Agarose (FMC BioProducts) による電気泳動で目的とするカルシトニンcDNAが増幅されたか否かを調べた。電気泳動後、DNAサイズのマーカーとして用いたサケのカルシトニン遺伝子(151bp)と同じ位置に泳動されたバンドのみをゲルから切り出し、マイクロチューブに移した。それを加熱、溶解させ、フェノール抽出及びエタノール沈殿を行い、得られた沈殿をTE bufferに溶解した。この溶液のDNA断片を、プラスミド (Novagen pT7Blue T-Vector) 及びコンピテントセル (宝酒造) を用いてサブクローニングした。その試料はDNAシーケンサー (Perkin-Elmer Japan Applied Biosystems 373S型) を用いて塩基配列を決定した。

ポジティブコントロールとして用いたサケ・カルシトニン (3.5 k Da) の位置とほぼ等しい位置に、カルシトニンの抗体に反応するバンドが検出された。しかしながら、このバンドは反応が弱く、シャープではなかった。従って、サンプルにはカルシトニン以外の他のタンパク質等も混在していると考えられた。またRP-HPLCにより、その物質は、サケ・カルシトニンが溶出した画分と同じ時間に溶出した画分に含まれていることがわかり、その疎水的性質も似ていた。したがって、イワナの頭蓋軟骨に存在するカルシトニン様物質は生化学的にイワナのカルシトニンである可能性が非常に高い。

in situ hybridizationで用いるプローブの有効性を確かめるために、鰓後腺を染めた結果、anti-sense鎖では強いシグナルが得られ、sense鎖では全くシグナルは検出されなかった。また、シグナルは個々の細胞の核には見られず、細胞質のみが染色された。これらのことはこのプローブがカルシトニンmRNAの検出に有効であることを示している。そこでこのプローブを用いて、*in situ* hybridizationを行った。その結果、頭蓋骨の中で顱頂骨と前額骨において、anti-sense鎖でのみシグナルが検出された。さらに、染色された軟骨細胞を高倍率で見ると、核は染まっておらず、細胞質だけが染まっていた。またRT-PCRの結果、カルシトニンをコードする大きさと同じ大きさのcDNA断片が増幅された。そのシーケンスを調べると、鰓後腺で発現しているカルシトニン分子をコードするアミノ酸配列と同じ配列であった。以上の結果を考え併せると、シロザケの頭蓋軟骨においてカルシトニンmRNAが発現していると結論づけることができる。

これまで哺乳類の軟骨においてカルシトニン遺伝子が発現しているという報告はない。一方、ヒトの関節軟骨細胞へサケ・カルシトニンを投与するとプロテオグリカンやタイプIコラーゲンの産生を刺激しその維持に働くこと、またタイプIコラーゲンを分解するコラーゲナーゼの活性を抑制し軟骨基質の分解を抑えることが知られている。これらの結果は、カルシトニンが軟骨細胞とその基質の維持に働くことを示唆している。また、軟骨細胞にカルシトニンを作用させるとアルカリフォスファターゼ活性が上昇し、石灰化が促されることも知られている。この結果は、カルシトニンが軟骨細胞の維持ではなく、逆に組織としての終焉に向かわせることを意味している。本研究の結果は、少なくともイワナとシロザケにおいて頭蓋骨の軟骨細胞がカルシトニンのmRNAを発現させて実際にカルシトニン分子を産生していることを強く示唆している。軟骨細胞は自己分泌(autocrine)あるいは傍分泌(paracrine)によって、自身のあるいは周囲の軟骨細胞の成長や維持、さらには脱分化に働いている可能性がある。今後詳細な検討が必要である。

(本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科生命・地球学専攻 小林 大樹君の修士論文の一環として行われた。)